

植物病原菌に対する抗菌物質を生産する

微生物の利用に関する研究 第5報

Streptomyces albus C 1-2 株の土壌中での Imotycin

の生産, および *Corticium centrifugum* に対する

土壌中での Imotycin の効果

井上 忠男・岡本 康博*・西門 義一

土壌中での微生物による対抗現象およびその機作については多くの研究がある (Grossbard, 1951; 西門 其他, 1949; Siminoff & Gottlieb, 1951; Gottlieb 其他, 1951~1955; Wright および Wright 其他, 1952~1957). また 明日山 (1957) は対抗現象の起る場面を, 1) 対抗菌の直接の寄生, 2) 対抗菌による栄養原の独占, 3) 対抗菌による抗生物質の生産, の3つの面から理解できるとの見解を述べている。

筆者らはさきに本研究の第2報 (1956) で, 2株の放線菌が無殺菌自然土で *Corticium centrifugum* によるササゲの白絹病抑制に有効であったことを報告した。その後この抑制効果の機作を明らかにするために一連の実験を続けた。第3報 (1956) では, これら対抗放線菌中の *Streptomyces albus* C 1-2 株が, 殺菌土を用いた土壌対抗法で, *Corticium centrifugum* および *Rhizoctonia solani* に示す対抗作用について, 種々条件を変えて実験し, 第4報 (1959) では, *Streptomyces albus* C 1-2 株が液体培地で生産する新抗菌物質 Imotycin を抽出精製した。本報では *Streptomyces albus* C 1-2 株の殺菌土中での Imotycin の生産を調べ, 殺菌土中でみられるこの放線菌の白絹病菌に対する対抗作用に, Imotycin が果している役割を推定した。さらに, Imotycin を土中に処理した場合の白絹病菌の生育, および土中での Imotycin の安定性などについても実験した。

材料および方法

実験方法の細部にわたつては, 実験の各項ごとに説明するが, ここでは一般的な実験方法と材料について述べる。

対抗放線菌 *Streptomyces albus* C 1-2 株および試験菌 *Corticium centrifugum* の培養と処理方法は, 第2報および第3報で報告した土壌対抗法の基本方法にしたがつた。Imotycin は第4報に示した精製物質を用い, 土に処理する場合には少量のメタノールに溶解した後, 水で所定濃度に希釈して土によく混合した。Imotycin の定量にはブイオン寒天を用い, *Bacillus subtilis* PCI 219 を試験菌とした濾紙片法で定量した。また, あらかじめ summarized papergram を調べて Imotycin を定性し, さらに溶菌性による阻止円の拡大も定性的な目安として観察した。定量時には, その度ごとに, 種々の濃度の Imotycin 溶液をしませた 径 6mm の濾紙片の阻止円

* 現在岡山県農業講習所

直径から得られる標準曲線を作つて、力価を求めた。(附図4参照)

対抗放線菌による土中での Imotycin 生産の検出は次の方法で行なつた。各処理 30g ずつ入れた5枚のシャーレの土を 30°C で17~18時間乾燥した後、各シャーレから20gをとり、メタノール 35ml で17~18時間室温で抽出(抽出操作は他の実験でもすべて室温)、その後15ml および10mlのメタノールでそれぞれ10分間抽出し、全抽出液を混和したものについて定量した。Imotycin の検出量は各処理それぞれの平均値を求め、さらに3回くり返した実験の成績を平均して実験結果に示した。実験2以下の Imotycin 抽出操作は、それぞれの実験結果の項で説明する。

放線菌の土中での生菌密度は potato sucrose agar (pH 7.0~7.2) を用いて、稀釈平板法でコロニーが1平板当り30~300の間に稀釈して調べた。

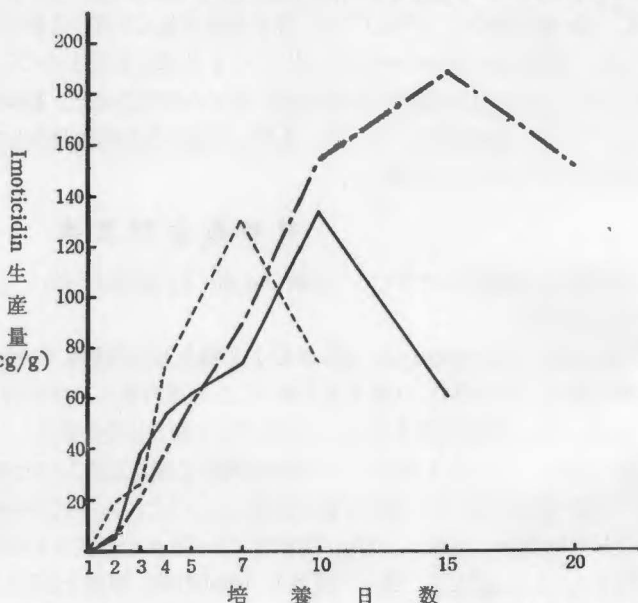
実 験 結 果

1. 殺菌土中での Imotycin の生産

土中での抗菌物質の生産については2, 3の報告があり、糸状菌の生産する gliotoxin, viridin, griseofulvin などは、いずれも土中での生産が認められている。しかし放線菌による土中での抗菌物質生産は、*Streptomyces venezuelae* による chloromycetin だけが化学的に土中から検出定量されている。

第4報でも述べたように、*Streptomyces albus* C 1-2 株の土一麁培養からの水、メタノールあるいはアセトン抽出液には、いずれも抗菌性が認められた。この抗菌性を示す物質は *Streptomyces albus* C 1-2 株が液体培養中に生産する Imotycin と比較して、抗菌性、*Bacillus subtilis* PCI 219 に対する溶菌性、summarized paperpram などの特性から同一物質と認められた。したがって *Streptomyces albus* C 1-2 株は殺菌土中で Imotycin を生産することがわかつたので、Imotycin 生産についての幾つかの実験を行ない、生産量を調べた。

a) 培養日数と Imotycin 生産量の消長 放線菌を土一麁培地に30°Cで培養し、1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 および20日後の Imotycin 生産量を調べた。第1図に実験結果を示すが、2日以上培養すれば濾紙片法で Imotycin の定量が可能になつた。実験は3回行なつたが、その都度、Imotycin 生産量が最高に達するまでの日数が異なり、しかも最高生産量にも差があつた。



第1図 放線菌培養日数と Imotycin 生産量の消長

最高生産量は 132.5mcg/g (乾土) から 190.7mcg/g の間であり、実験回によつて約 60mcg/g のちがいがあつたが、Imotycin の土一黴培地での最高生産量は少なくとも 130 mcg/g 以上に達することがわかつた。Imotycin 生産量が最高に達した後、土中の Imotycin 濃度は急速に低下するが、1 月以上の培養でもなお、Imotycin を検出することができた。第 1 図からみると、Imotycin 生産量が比較的短期間内に最高になる場合には、最高生産量が少なく、土中の Imotycin 濃度の減少速度も早いようである。Imotycin の消長にともなう放線菌の土中での生菌密度の変動を調べた、第 1 図に実線で示した実験回について調査した結果を第 1 表に示す。土

第 1 表 *Streptomyces albus* C 1-2 株の土一黴培養の培養日数と土中生菌密度

培 養 日 数	1	2	3	4	5	7	10	15
土中生菌密度 ($\times 10^6$)	5.9	11.2	50.8	77.1	181.7	190.2	5400.5	4685.3

第 1 図の実線で示した実験の調査結果

中での Imotycin 生産量は放線菌の生菌密度と密接な関係があり、Imotycin の土中濃度が最高の時には放線菌数も最大であつた。しかし、Imotycin 生産量の消長が実験回により相当異なつたと同様に、土中の放線菌密度も実験回により均一な数値は得られなかつた。第 3 報で行なつた実験 E で、培地の水分含量の変動により対抗作用が大きく影響されることを述べたが、この実験の場合、培地の水分含量の変動は実験回によつてさけることができなかったことも、成績が均一に得られなかつた一因と考えられた。

b) *Streptomyces albus* C 1-2 株が *Corticium centrifugum* に対抗している場合の Imotycin の生産 *Streptomyces albus* C 1-2 株が土壌対抗法で *Corticium centrifugum* に対抗している場合に、Imotycin の生産が行なわれるかどうかを知るために実験した。土一黴培地に (1) 対抗放線菌だけ、(2) 対抗放線菌をあらかじめ 2 日間培養した後に *C. centrifugum* を移植、(3) 両菌を同時に植付け、それぞれ 27°C で 7 日間培養し、Imotycin 生産の有無、生産量の多少を調べた。また、*C. centrifugum* の生育の様子も同時に記録した。(附図 1, 2, 3)。第 2 表に調査結果を示すが、*Streptomyces albus* C 1-2 株を *C. centrifugum* に対抗させた場合にも Imotycin が生産されることがわかつた。対抗菌と *C. centrifugum* を同時に植付けて

第 2 表 *Streptomyces albus* C 1-2 株を *C. centrifugum* に対抗させた場合の Imotycin 土中生産

	1	2	3	4
Imotycin 生産量 (mcg/g 乾土)	136.0	113.5	83.7	0
<i>C. centrifugum</i> 生育度 (%)	—	14.4	64.3	100.0
菌 核 形 成 量	—	— \sim ±	± \sim +	+ \sim ++

1: *Streptomyces albus* C 1-2 株だけ

2: *Streptomyces albus* C 1-2 株を 2 日培養後、*C. centrifugum* を移植

3: 両菌は同時に植えつけ

4: *C. centrifugum* だけ

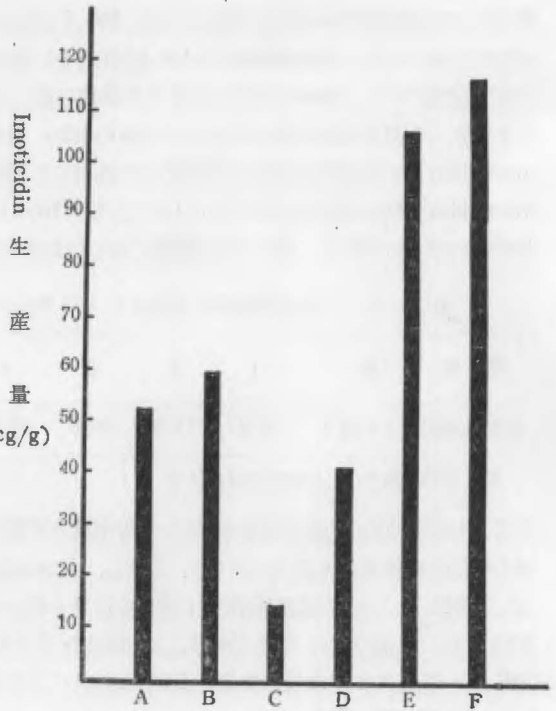
3 回の実験の平均値を示す

培養した場合、培地土中に生産された Imotacidin の濃度は、放線菌だけの培養の場合の約 64 % であった。また、*C. centrifugum* を対抗菌より 2 日後に移植した場合では約 82 % の Imotacidin 生産が検出された。一方、*C. centrifugum* の生育は無処理区に比べると、(2) 区で 14.4 %、(3) 区で 64.3 % にとどまった。

c) Imotacidin の生産におよぼす肥料の影響 土一麴培地に加える肥料の種類により、Imotacidin の生産量 (mcg/g) に差があるかどうかを調べた。畑土に硫安、硝酸カリ、過磷酸石灰、石灰をそれぞれ培地の 1 % の割合で加えた区を作り、対照にはこれらの肥料成分を加えない区と、砂糖および石灰を加えてできる基本組成の土一麴培地区の 2 区を設けた。*Streptomyces albus* C 1-2 株をこれらの培地に植付け、30°C で 7 日間培養後、Imotacidin 生産量を測定した。肥料を加えたことにより培地の土壌 pH が変化したことが、高圧殺菌後の土壌 pH は次に示すとおりであった。

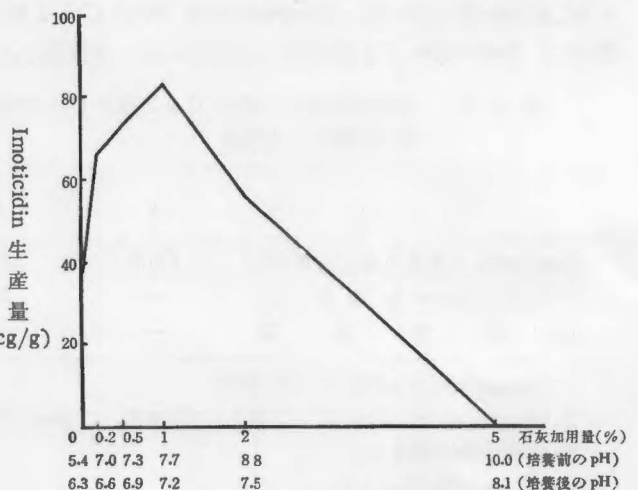
	pH
硫 安	5.5
石 灰	7.5
硝 酸 カ リ	5.6
石灰、砂糖 (土一麴培地)	7.5
過磷酸石灰	5.6
肥料無添加	5.9

3 回くり返した実験結果の平均を第 2 図に示す。肥料を加えない畑土区に比べて、硝酸カリ、過磷酸石灰加用区では Imotacidin の生産は少なく、硫安、石灰加用区では多



第 2 図 Imotacidin 生産におよぼす肥料の影響

- A: 無 添 加
- B: 硫酸アンモニヤ
- C: 硝 酸 カ リ
- D: 過 磷 酸 石 灰 (肥料用)
- E: 石 灰
- F: “土一麴 培 地” (石灰、砂糖)



第 3 図 Imotacidin 生産におよぼす石灰の影響

かつた。とくに、石灰を加えた区での Imotycin 生産量は土一黴培地での生産量の約 91 %で、肥料無添加の場合の約 2 倍にも達した。

d) Imotycin の生産におよぼす石灰の影響 前記実験 c) から、殺菌土中での Imotycin の生産に石灰がとくに有効であることがわかつたので、培地中の石灰の含量を変えて Imotycin の生産量を調べた。培地重量の 0.2, 0.5, 1, 2 および 3 % と石灰加用量を変えた培地に、*Streptomyces albus* C 1-2 株を植え、30°C で 7 日間培養し、Imotycin の生産量を調べた結果が第 3 図である。石灰含量が培地重量の 1 % の場合に Imotycin の生産量は最高で、石灰を加えない場合の 2 倍以上にも達した。培地の pH は放線菌を培養することにより中性に近づく傾向があり、石灰含量 1 % の場合には放線菌の培養によつて培地土壌の pH は 7.7 から 7.2 に下つた。

2. *Streptomyces albus* C 1—2 株が *Corticium centrifugum*

に対して殺菌土中で示す抑制効果の解析

前述の一連の実験から、*Streptomyces albus* C 1-2 株は殺菌土（土一黴培地）中で少なくとも最高 130mcg/g の Imotycin を生産することが明らかになつた。このことから、第 2 報の無殺菌土を用いた対抗放線菌による白網病抑制試験で得られた効果、および、第 3 報に詳述した殺菌土を用いた土壌対抗法でみられた試験菌抑制効果が、土中に生産された Imotycin によると結論することは早計である。しかし、土中での Imotycin の生産量は Gottlieb ら (1952) が報告した *Streptomyces venezuelae* による chloromycetin の生産量に比べてはるかに多いので、Imotycin がこれら対抗現象にかなり重要な役割を果していると推論することは妥当と考えられる。そこで、*Streptomyces albus* C 1-2 株のあらゆる対抗現象に果している Imotycin の役割を知る目的で、第 3 表に示すような処理を含む実験を行なつた。

第 3 表 *C. centrifugum* 生育抑制効果解析のための実験区の設定

実 験 区	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Streptomyces albus</i> C 1—2 株を培養					○	○	○	○
メ タ ノール 抽 出	○	○			○	○		
砂 糖 お よ び 黴 添 加		○		○		○		○
高 圧 殺 菌 後 の 土 の pH	7.2	7.2	7.2	7.2	6.8	7.0	7.0	6.8

○は 処理を行なつたことを示す

A～Dの各区は石灰を加え、E～Hの各区は放線菌培養後の処理を示す

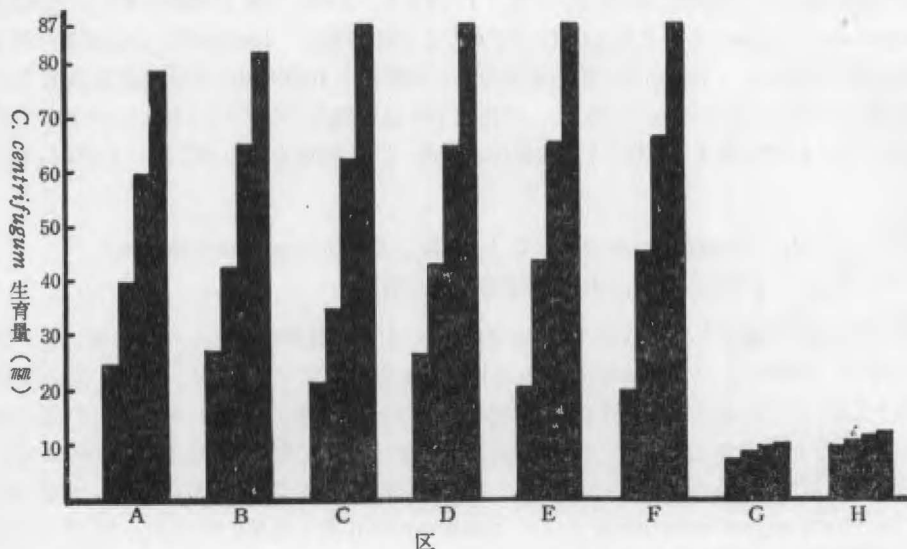
培地A～D：土；E～H：土一黴培地

各区 30 g ずつ培地を入れたシャーレ 10 枚

メタノール抽出はA～D、E～Hをよく混ぜて、それぞれの半量（シャーレ20枚分）について行つた

あらかじめ *Streptomyces albus* C 1-2 株を 7 日間培養した土一黴培地（シャーレ 40 枚、各シャーレ 30 g）を 30°C で 17～18 時間乾燥し、よく混合した後、その半量を 1.5 倍量のメタノールで 17～18 時間抽出し、その後さらに培地と等量のメタノールで 10 分間ずつ 3 回抽出した。この抽出法で土中の Imotycin は大部分が抽出される。抽出後の培地土壌およびメタノールで処理しなかつた放線菌培養土は第 3 表に示すような実験区に分けた。これらの他に、放線菌を培養しない

土（石灰を加えた）も同じようにメタノール抽出区、未抽出区を作った。また、放線菌培養区には栄養原補給の意味で砂糖、麴を加えた区も設けた。こうして調製した培地はそれぞれの30gずつを径8.7cmのシャーレ10枚に入れ、常法どおりに殺菌し、*Corticium centrifugum* を植付けて27°Cで培養し、2, 3, 4, 5日目の生育量を測った。実験結果を第4図に示す。



第4図 *C. centrifugum* 生育抑制効果解析 (第3表参照)
培養日数2, 3, 4, 5日の菌叢直径を示す

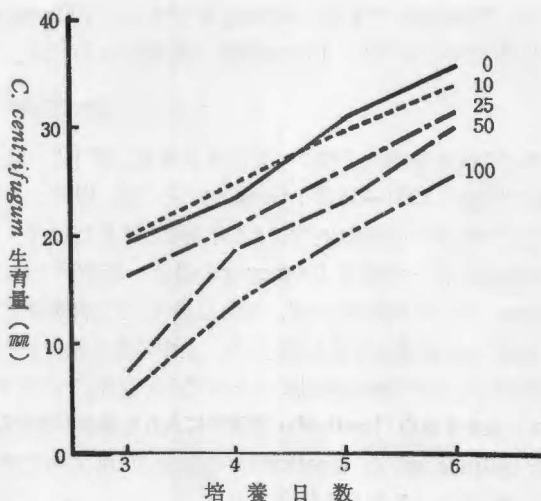
対抗放線菌を培養しなかつた土では、メタノール抽出による *C. centrifugum* の生育への影響は少なく (A区とC区あるいはB区とD区の比較)、補給栄養原の効果はわずかで、いずれの処理区でも *C. centrifugum* の生育は良好であつた。一方、対抗放線菌を培養した土では、メタノール抽出の影響は非常に大きく、メタノール抽出を行なわなかつたG区、H区では補給栄養原を加えても試験菌抑制が強くあらわれたのに比べ、メタノールで処理したE区、F区では、試験菌の生育は対抗放線菌を培養しなかつたC区、D区 (土一麴培地区) と同じように良好であつた。この実験結果から、少なくとも *Streptomyces albus* C 1-2 株を培養した殺菌土中の、Imotycinを含むメタノール可溶性物質が対抗現象に大きな役割を果していたことが明らかになった。

3. 土中での *Corticium centrifugum* の生育におよぼす Imotycin の影響

筆者らのこれまでの実験結果、とくに、殺菌土中での試験菌抑制効果の解析結果から、土中での *Corticium centrifugum* の生育抑制に Imotycin が大きな役割を果していることが推測されたので、精製した Imotycin を殺菌土と無殺菌土に加えて、はたして *C. centrifugum* の生育が抑制されるかどうかを調べた。

a) 無殺菌土中で *C. centrifugum* の生育におよぼす Imotycin の影響 殺菌水を用いて Imotycin 溶液を調整し、乾土1g当り10, 25, 50および100mcgになるように殺菌してない畑土によくまぜたものを、シャーレに40gずつ入れ、直径10mmの *C. centrifugum* の寒天培養片を2ヶずつ土中に浅く埋め、ふたを外したまま室内に放置して培養した。試験菌の生育は3~6日

の間(1957年10月18~21日)土の表面に生育した菌叢直径を測定できた。それ以後は培地土壌が乾燥したため、試験菌の生育が進まなかつたので測定しなかつた。処理後6日までの試験菌の生育は第5図のようになった。実験結果は Imoticiöin 処理の各濃度ともシャーレ5枚の測定値の平均である。菌叢が土の表面にあらわれてくる3日目までは、50および100mcg/gの Imoticiöin 処理区では *C. centrifugum* の生育が抑制されたが、それ以下の濃度ではあまり影響がなかつた。また、4日目以後の試験菌の生育速度は、100mcg/gの処理区でも無処理区とあまり差がなかつた。したがって、無殺菌土で *C. centrifugum* の生育を抑制する Imoticiöin の土中濃度は、この実験の範囲では50~100mcg/gで、培養3日目までは抑制効果があつたと考えられる。



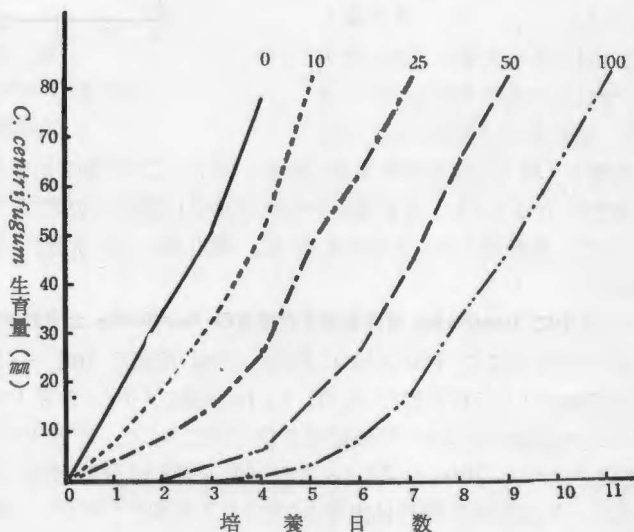
第5図 無殺土中での *C. centrifugum* の生育
におよぼす Imoticiöin の影響

図中の数字は Imoticiöin の土中濃度 (mcg/g) を示す

b) 殺菌土中で *C. centrifugum* の生育におよぼす Imoticiöin の影響

あらかじめ殺菌した畑土に、前の実験と同様に Imoticiöin を加え、所定の Imoticiöin 濃度の土壌培地を作つた。これを30gずつ各処理5枚のシャーレに入れ、土の表面に径5.5mmの *C. centrifugum*

寒天培養片を2ヶ置き、27°Cで11日間培養した。試験菌の生育は毎日測定し、各実験回、各処理の平均を求め、3回の実験の平均を第6図に示した。培地土中の Imoticiöin 濃度が高いほど試験菌の生育はおくれたが、100mcg/gの濃度でも11日目にはシャーレ全面に生育した。培養4日目の測定結果について、処理間の差の有意性を調べたところ、50mcg/gと100mcg/gの両処理間をのぞき、どの処理間にも1%水準で有意差があつた。図から明らかなよう



第6図 殺菌土中での *C. centrifugum* 生育に
およぼす Imoticiöin の影響

実際の生育量はこれより3mm多い

に、*C. centrifugum* の生育に抑制効果のある期間は、Imoticiöin の濃度10mcg/gで2~

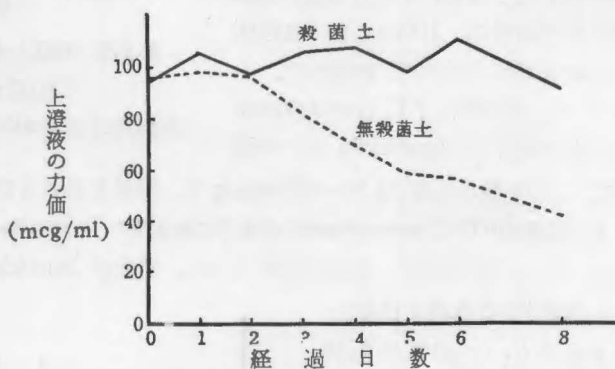
3日, 25mcg/g で4日, 50mcg/g で6日, 100mcg/g で8~9日であり, それ以後は無処理区と同じように生育し, Imotycin の影響はなくなった。

4. 土中の Imotycin の安定性

多くの抗生物質は土壌中では活性が極度に低下し, 土中の抗菌性は認められなくなる (Gottlieb その他, 1951~1955; Gregory, その他 1952; Jefferys, 1952)。この原因としては土壌粒子による吸着や土壌微生物による分解などが考えられる。本報告に述べたこれまでの実験の結果, Imotycin は土中濃度 100mcg/g の場合, 無殺菌土中で3日間, 殺菌土で9日間は *C. centrifugum* の生育を抑制したが, それ以後はともに抑制効果がみられなかった。このことは Imotycin の土壌による吸着度が進んだためか, 土中の微生物により分解されたかして, 不活性化が起つたためと考えられたので Imotycin の土中での安定性について 2, 3 の実験を行なった。

a) 土を多量の Imotycin 溶液の中に入れた場合の液中の Imotycin 濃度の変化 試験管に入れた 100mcg/ml の Imotycin の溶液 20ml の中に畑土 5g (殺菌土および無殺菌土) を入れて

室内に置き, 7日目を除き8日目まで毎日上澄液の Imotycin 力価を調べた。各処理は試験管2本を含み, 実験は3回くり返した。第7図に実験の平均を示すが, 殺菌土に処理した場合, 上澄液の力価は実験期間中, ほぼ 100 mcg/ml 程度で, ほとんど力価の減少はみられなかった。一方, 無殺菌土では3日目から次第に力価は低下し, 8日目には約 40mcg/ml になった。無殺菌土に処理した区では,



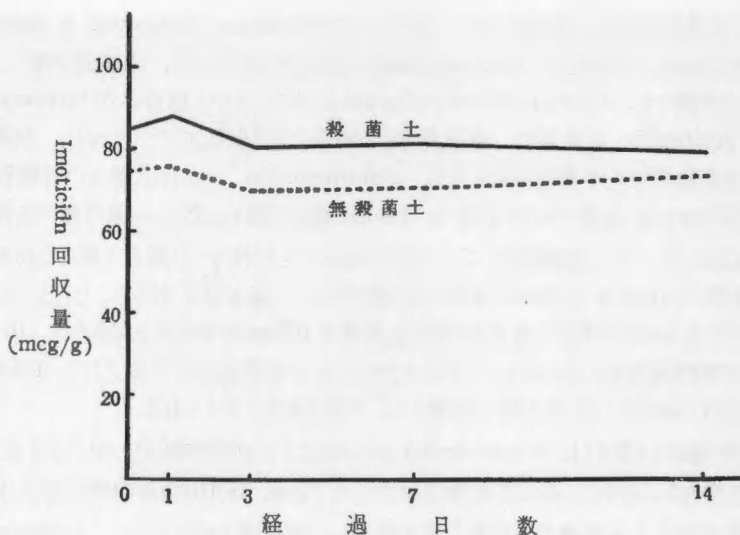
第7図 Imotycin 溶液に土を入れた場合
上澄液力価の消長

上澄液中に種々の微生物が多量に発育してきた。この実験の結果から, Imotycin の殺菌土への吸着は起つたとしても, 吸着量が少なかったため上澄液の力価はあまり低下しなかったものと考えられた。また, 無殺菌土での力価の減少には, 微生物による分解がかなりの部分を占めていたものと推測された。

b) 土中に Imotycin 溶液を加えた場合の Imotycin 土中濃度の消長 殺菌土および無殺菌土のそれぞれ 10g に Imotycin 200mcg/ml 溶液を 5ml ずつ加え (土 10g 当り Imotycin 1mg の割合), 当日および, 1, 3, 7, 14 日後にメタノールで Imotycin を抽出定量した。2 回くり返した実験の平均から実験結果を第8図に示した。乾土 1g 当りの Imotycin 回収量は次の方法で求めた。10ml のメタノールで5回, 毎回10分間室温で抽出し, 毎回の抽出液の力価を調べた。各抽出回の積算抽出量から描かれる曲線にもとづき, 抽出可能な回収極限量を推定した。実際には5回目までのメタノール抽出で, 土中の Imotycin はほとんど回収できた。

第8図に示すように, 殺菌土で1日後までの回収量はほぼ 85~90mcg/g で, 2日目には減少して約 80mcg/g になるが, それ以後は14日後になってもほとんど同量の Imotycin が回収できた。無殺菌土でも殺菌土の場合と同じような傾向がみられたが, 殺菌土の場合に比べて, 回収量は約 10mcg/g だけ少なかった。

この実験は前の実験と異なり, Imotycin 溶液は培地土壌の飽水量以内で加えてあるので, 条件がかなり変つてゐるが, 土に加えた Imotycin の約 20 %が殺菌土で, 25 %が無殺菌土で不活性化された。殺菌土の場合の不活性化は, 土壌への吸着によるものであり, 無殺菌土の場合の不

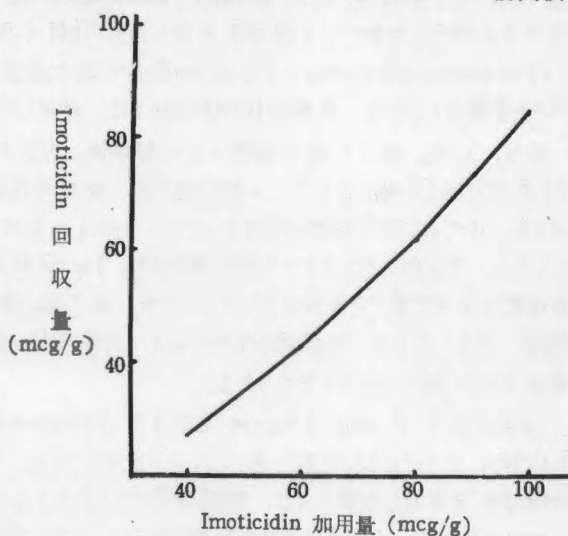


第8図 土中に加えた Imotycin の活性の消長

c) 殺菌土に加えた Imotycin の量とその土からの Imotycin 回収量との関係

前実験で

100mcg/g の Imotycin を殺菌土に加えると, 約 20 % の Imotycin が吸着されることがわかつたので, さらに 100 mcg/g 以下の濃度になるように Imotycin を殺菌土に加えた場合, 土への吸着量がどう変るかを調べた。40, 60, 80 および 100mcg/g になるように Imotycin 溶液を調製して殺菌土 10 g に加え, ただちに前の実験と同様の操作で Imotycin を回収定量した。第 9 図に 3 回くり返した実験結果の平均を図示したが, 40~100 mcg/g の Imotycin 濃度では, ほぼ一様に, 約 20~25 % の Imotycin が土に吸着された。



第9図 殺菌土に加えた Imotycin の回収量

考 察

Gottlieb およびその一派は主に放線菌の生産する抗菌物質について, また Wright およびその一派は糸状菌の生産する抗菌物質について, 土中での生産を調べた。糸状菌の生産する抗菌物質の中, gliotoxin, viridin, griseofulvin, frequentin, gladiolic acid など多くの物質が土中で生産されることが明らかにされている。一方, Gottlieb ら(1952)による放線菌の場合には, streptomycin をはじめ多くの抗菌物質は土中での生産を検出することができなかつたが, chloromycetin の場合に

だけは検出定量して研究された。彼らは *Streptomyces venezurae* を *Bacillus subtilis* に対抗させた場合、土中での chloromycetin の生産速度がおくれ、生産量が減少したとしている。本報告の実験でも、*Corticium centrifugum* に対抗している場合の *Streptomyces albus* C 1-2 株の Imotycin 生産量は、放線菌だけの場合よりは少なかった。しかし、放線菌によつて生産された抗菌物質の土中濃度を比べると、chloromycetin の場合、種々の有機質を加えた好条件下で約 25 mcg/g 前後であるのに比べ、Imotycin の場合には土一黴培地の条件で約 130 mcg/g 以上に達した。また、放線菌を *C. centrifugum* に対抗させた場合（例えば両菌を同時に培養開始）でも約 87 mcg/g の Imotycin が生産された。第 4 報で明らかにしたように、*C. centrifugum* に対する Imotycin の最低有効阻止濃度は 100 mcg/ml 以上であるが、10 mcg/ml の低濃度でも発育抑制効果がみられる。このことから、土一黴培地中に生産される Imotycin の量は、*C. centrifugum* の生育を強く抑制するに十分であると考えられる。

Wright (1956) は *Trichoderma viride* による gliotoxin の土中での生産は肥料を加えることにより増加し、とくに、硫酸が有効であつたとしている。Gottlieb ら (1952) は土中での chloromycetin の生産量に土中有機質の種類と量が関係し、有機質を加えないと、*S. venezurae* は *B. subtilis* に対抗できなかったとし、trypton を土に加えた場合の生産量は約 25—27.8 mcg/g におよび、green alfalfa hay を加えた場合には 1.4mcg/g、oat straw や澱粉を用いた場合にはほとんど生産されなかつたとしている。また Wright (1954, 1955) は Wareham soil 中での gliotoxin 生産量は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を加えて土壌 pH を高めると、pH 4.0~7.4 の範囲では pH が高いほど増加し、*Penicillium nigricans* による griseofulvin の生産量は pH を 5.3~6.1 に高めることにより増すことを報告している。本報の Imotycin では、殺菌した畑土でも約 50 mcg/g 程度生産されるが、硫酸、石灰、黴+石灰+砂糖（土一黴培地）を加えた場合には生産量の増加が認められ、とくに石灰を加えた場合および土一黴培地では、肥料無添加の場合の約 2 倍の Imotycin が生産された。中でも石灰の影響が大きかつたが、土の 1% 前後加えた場合に Imotycin 生産量もつとも多く、5% 加えるとかえつて悪影響があり、Imotycin の生産は認められなかつた。土に加える有機質を色々に変えた実験は行っていないが、第 3 報の成績からみて、砂糖、黴、インゲン茎葉乾燥物、稲わらなどは、放線菌の生育を促して対抗作用を強めると同時に、Imotycin の生産量を増加させるに役立つものと考えられる。

土壌対抗法で *C. centrifugum* に対する *Streptomyces albus* C 1-2 株の対抗作用に、Imotycin がどのような役割を果しているかを知るために、*C. centrifugum* 抑制の主因として Imotycin を仮定し実験したが、抑制効果のみられる土からメタノール可溶成分を抽出し去ると、*C. centrifugum* の生育は極めて良好になつた。また、対抗放線菌を培養しなかつた殺菌土中のメタノール可溶成分は、*C. centrifugum* の生育にほとんど影響をもつていなかったことも考え合わせると、この場合の試験菌抑制効果の主因は Imotycin と考えてよいようであつた。殺菌土を用いたこの実験結果から、第 2 報でみられた無殺菌自然土中での *C. centrifugum* 抑制効果に、Imotycin が主因として働いていたと結論するのは早断であるにしても、自然土中に加えた Imotycin の土中での活性の消長を調べた本報の実験結果も考慮に入れると、対抗放線菌の生産した Imotycin が、白絹病の抑制にかなり重要な役割を果していたものと云える。

一般に、抗菌物質を土中に加えた場合、土に吸着されたり、土中の微生物によつて分解されたりして、著しく不活性化される。actinomycin (Martin & Gottlieb, 1955) は土に吸着されるが、抗

菌力が強いので、吸着されずに残った極少量でも、*Bacillus subtilis* の発育を抑制し、terramycin は pH 6.2 の土で 200mcg/g, pH 5.6 の土では 500 mcg/g 以上を加えると、*B. polymyxa* の発育を抑制したと云う。また chloromycetin (Gottlieb & Siminoff, 1952) は *B. subtilis* の生育を 10 および 15 mcg/g で或程度抑制したと報告されている。Imotycin の場合では、実験結果に示したように、50mcg/g を無殺菌土に加えると、少なくとも 3 日間、また殺菌土では 10mcg/g で 2~3 日、25mcg/g で 4 日、50mcg/g で 6 日、100mcg/g では 8~9 日間それぞれ試験菌抑制効果がみられた。これらの実験結果も、対抗現象に Imotycin が果たした役割についての考察の 1 つの裏付けになるものと考えられる。

Gottlieb & Siminoff (1952) によると、chloromycetin は殺菌した自然土中で *S. venezuelae* により生産され、この生産量は或種の有機質を加えることにより増加した。また、彼等は土中に加えた chloromycetin の回収率が 100mcg/g までは殺菌土で 60~70 % であり、さらに、50mcg/g 加えた場合殺菌土中では 2 週間後まで約 40mcg/g の活性が保たれ、無殺菌土では 2, 3 日後から急速に不活性化が起つたと述べている。Imotycin の土中での生産量などについては、すでに本考察中で論じたとおりで、chloromycetin よりも生産される量が多いこと以外は似た傾向がみられた。土中に加えた Imotycin 回収率や土中での活性保持期間についても、ほぼ chloromycetin と似た傾向であつた。ただ、土の量に対する Imotycin 溶液が土の保水量以上の場合には、chloromycetin の場合と同様な活性の消長がみられたのに反し、土に Imotycin 溶液を浸みこませた場合には、殺菌土でも無殺菌土でも、とくに著しい活性の変動はみられなかつた。殺菌土に加えた Imotycin の回収率は chloromycetin の場合より幾分高く、100mcg/g までの濃度では約 80% が回収された。

摘 要

本報は第 2, 第 3 報で報告した *Streptomyces albus* C 1-2 株の殺菌土および無殺菌土での *Corticium centrifugum* に対する対抗作用に、抗菌物質 Imotycin (第 4 報に報告した) がどのような役割をもっているかを検討した実験の報告である。

1) *Streptomyces albus* C 1-2 株は殺菌した自然土中で約 50mcg/g (乾土)、土一鉢培地で約 130mcg/g の Imotycin を生産した。

2) *Streptomyces albus* C 1-2 株を *C. centrifugum* に対抗させた場合にも Imotycin は生産されるが、対抗放線菌だけを生育させた場合よりは少なかつた。

3) 土中での Imotycin の生産には石灰を加えることが有効で、とくに土の 1 % 前後の割合で加えた場合、Imotycin の生産量は著しく増加した。

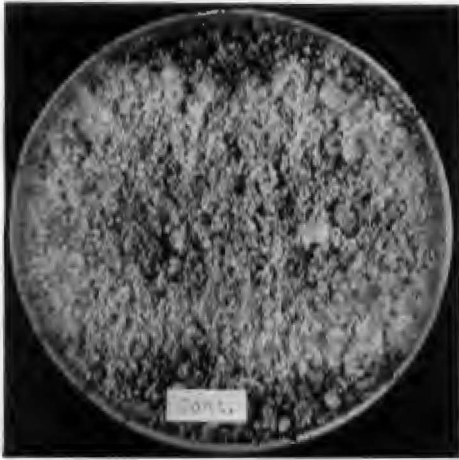
4) *Streptomyces albus* C 1-2 株を培養した土一鉢培地からメタノール可溶成分 (Imotycin を含む) を除き、*C. centrifugum* を植付けると、放線菌を植えない土一鉢培地上と同様に良好な生育を示した。メタノール可溶成分を除かない場合には、*C. centrifugum* はほとんど生育できなかつた。放線菌を植えない土一鉢培地のメタノール可溶成分は *C. centrifugum* の生育にほとんど影響しなかつた。

5) 土に Imotycin を加えた場合、無殺菌土では 50 および 100mcg/g で 3 日間 *C. centrifugum* の生育が抑制された。殺菌土では 10, 25, 50, 100mcg/g でそれぞれ 2~3, 4, 6, 8~9 日間生育が抑制された。

6) 土中に 100mcg/ml の Imotycin 溶液を加えた場合、殺菌土中では 2 週間後まで約 80 % が活性を失わなかった。無殺菌土では土に加えた Imotycin 溶液が土の保水量以上のときには、2 ~ 3 日後から急速に活性が低下したが、量が少なければ殺菌土の場合と同様に活性が保たれた。また 40 ~ 100mcg/g の Imotycin 溶液を加えた殺菌土からの Imotycin 回収率は約 80 % であった。

文 献

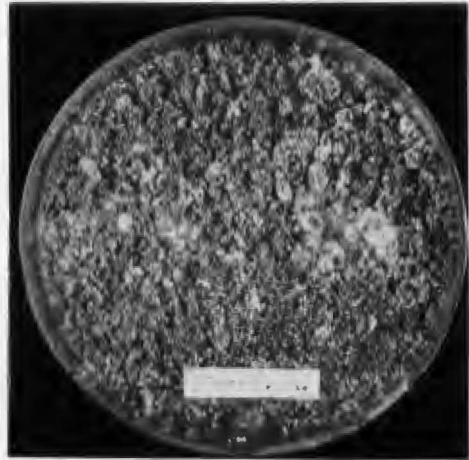
- 明日山秀文. 1957. 土壌伝染病の生態. 植物防疫 11 : 455—458.
- Gottlieb, D. and Siminoff, P. 1952. The production and role of antibiotics in the soil. II. Chloromycetin. *Phytopathology* 42 : 91—97.
- Gottlieb, D., Siminoff, P. and Martin, M. M. 1952. The production and role of antibiotics in soil. IV. Actidione and clavacin. *Phytopathology* 42 : 493—496.
- Gregory, K. F., Allen, O. N., Riker, A. J. and Peterson, W. H. 1952. Antibiotics as agents for the control of certain damping-off fungi. *Amer. J. Bot.* 39 : 405—415.
- 井上忠男, 岡本康博, 西門義一. 1959. 植物病原菌に対する抗菌物質を生産する微生物の利用に関する研究. 第 4 報. 農学研究 46 : 120—128.
- Jefferys, E. G. 1952. The stability of antibiotics in soils. *J. gen. Microbiol.* 7 : 295—312.
- Martin, N. and Gottlieb, D. 1952. The production and role of antibiotics in the soil. III. Terramycin and aureomycin. *Phytopathology* 42 : 294—296.
- Martin, M. and Gottlieb, D. 1955. The production and role of antibiotics in soil. V. Antibacterial activity of five antibiotics in the presence of soil. *Phytopathology* 45 : 407—408.
- 西門義一, 大島俊市, 石井博, 森田日出男. 1949. 拮抗微生物利用による作物病害防除の研究. 第 1 報. 農学研究 38 : 46—50.
- 西門義一, 井上忠男, 岡本康博. 1956. 植物病原菌に対する抗菌物質を生産する微生物の利用に関する研究. 第 2 報. 農学研究 43 : 165—171.
- 西門義一, 岡本康博, 井上忠男. 1956. 植物病原菌に対する抗菌物質を生産する微生物の利用に関する研究. 第 3 報. 農学研究 44 : 119—126.
- Siminoff, P. and Gottlieb, D. 1951. The production and role of antibiotics in the soil. I. The fate of streptomycin. *Phytopathology* 41 : 420—430.
- Wright, J. M. 1952. Production of gliotoxin in unsterilized soil. *Nature* 170 : 673—674.
- Wright, J. M. 1954. The production of antibiotics in soil. I. Production of gliotoxin by *Trichoderma viride*. *Ann. appl. Biol.* 41 : 280—289.
- Wright, J. M. 1955. The production of antibiotics in soil. II. Production of gliseofulvin by *Penicillium nigricans*. *Ann. appl. Biol.* 43 : 288—296.
- Wright, J. M. 1956. The production of antibiotics in soil. III. Production of gliotoxin in wheatstraw buried in soil. *Ann. appl. Biol.* 44 : 461—466.
- Wright, J. M. 1956. The production of antibiotics in soil. IV. Production of antibiotics in coats of seeds sown in soil. *Ann. appl. Biol.* 44 : 561—566.
- Wright, J. M. and Grore, J. F. 1957. The production of antibiotics in soil. V. Break-down of gliseofulvin in soil. *Ann. appl. Biol.* 45 : 36—43.



附図 1

土 壤 対 抗 法 (培養日数 4 日)

Cont.: *C. centrifugum* だけ



附図 2

土 壤 対 抗 法 (培養日数 4 日)

Treat A: 対抗放線菌と *C. centrifugum* を同時に植えつけ



附図 3

土 壤 対 抗 法 (培養日数 4 日)

Treat B: 対抗放線菌を *C. centrifugum* より 2 日早く培養,ほとんど完全に抑制している



附図 4

Imotycin の定量

真上から左まわりに 100, 75, 50, 25, 10 mcg/ml の阻止円を示す